微细胞（microcell）的制备及其生物学特性

单祥年　贺 林　王世浚
（南京铁道医学院细胞遗传研究室）

摘　要

本文比较了单纯用秋水酰胺（1μg/ml）和秋水酰胺（1μg/ml）加细胞松弛素B（1μg/ml）复合处理体外培养的细胞株的微细胞生产率，发现后一种方法大大提高了微细胞的获得率。对于微核化细胞的离心脱核方法以及粗制的微细胞纯化方法亦作了改进。同时研究了微细胞的存活时间以及它的大小等生物学特性。并且研究了CHO Wg3-h SL7 HFC四种细胞在秋水仙胺和秋水仙胺加细胞松弛素B复合处理后的微核率，发现后一种方法能促进细胞的微核化，但不同的细胞株对这两种有丝分裂阻断剂敏感性差异很大，体外未经转化的人的正常成纤维细胞对有丝分裂阻断剂的敏感性与细胞年龄有密切关系，越年轻越敏感。

关键词：微细胞　细胞株　细胞松弛素　基因

Ege等1974年通过秋水仙素处理，使大鼠成肌细胞微核化，然后加细胞松弛素B（cytochalasin B, CB）离心脱核，获得比原来的细胞小得多的亚核颗粒，这种亚核颗粒的外面有微量的细胞质与细胞膜，Ege等把这种颗粒叫做微细胞（microcell）。

目前，微细胞主要用来介导染色体转移，它能把完整的染色体从一种哺乳动物的细胞中转入另一种哺乳动物的细胞中，从而可用来进行人类和哺乳动物的基因定位、基因表达和基因调控的研究（Fournier, 1977; Wortor, 1981）。由于微细胞比全细胞核小得多，因此当它和受体的全细胞融合后，只介导一条或几条染色体到受体细胞中，这就减少了杂种细胞基因组的复杂性，简化了供体表现型和供体染色体之间的关系，缩短了基因定位的时间。目前已经用这个方法定了人7号染色体上的胶原蛋白结构基因（Sykes, 1978）。另外，用微细胞的方法研究细胞的恶性表现型的表达和抑制也是很有前途的（颜永杉，1983）。

本文在我们实验室的条件下，研究了微细胞的制备及其生物学特性，并比较了四种细胞株对有丝分裂阻断剂的敏感性。

本文1985年2月19日收到，1985年11月20日收到修改稿。

材料和方法

（一）微核化　我们用CHO（仓鼠卵巢细胞）、Wg3—h（仓鼠肺成纤维细胞）、SL_7（男胚肺成纤维细胞）、HFC（成人包皮成纤维细胞）四种细胞株。其中HFC是我们实验室自已建立的，其余三种细胞株系从其它实验室引进。培养基组成是$RPMI_{1640}$培养基加20%小牛血清（自制）。细胞接种在预先制备好的5.8×1.3cm塑料片上，这种塑料片是用热针从塑料培养瓶上切割下来的。在接种细胞前，塑料片在500μg/ml伴刀豆球蛋白A（concanavalin，A）溶液中浸泡一分钟。细胞接种数为1×10^6个。细胞接种后24小时（SL_7和HFC为36小时）即细胞处于对数生长期，添加秋水仙胺（colcemid），最终浓度为1μg/ml。继续培养24小时，再加CB，其浓度为5μg/ml，再继续培养12小时，即可取出塑料片进行离心制备微细胞。

（二）离心　将上述塑料片从培养皿中取出，将两片塑料片背靠背（细胞面为正面）直立于含10μg/ml CB的全培养基离心管中，37°C孵育2小时。然后将离心管置于腔温在34°C的高速离心机（西德产CHRISI）中，以1900转/分离心30分钟，在此期间内腔温一直要控制在32°C—35°C，此时离心管中培养基的温度则为34°C—37°C。

（三）微细胞的纯化　①将离心后的细胞团块用无血清培养基稀释至20ml，用孔径5μ的微孔滤膜（上海产）压滤。②将离心后的细胞团块用无血清的培养基稀释成1ml的细胞悬液。非常细心的滴注到预先制备好的1—3%牛血清白蛋白梯度的最上层，梯度液的总体积为50ml，pH 7。在室温下自然沉降3小时，然后取上20ml梯度液离心、洗涤收获纯化的微细胞。

（四）存活率计算　将纯化后的微细胞接种在含全培养基并放有盖玻片的培养皿中。置37°C下培养，每隔6小时取一片盖玻片用台酚蓝染色计死活细胞比例。

（五）微细胞和全细胞的测量　纯化后的微细胞直接滴片、Giemsa染色，用显微测微器在油镜下测量100个细胞，计算平均直径。

（六）微核率的比较　将四种细胞分别接种在放有盖玻片的培养皿中，每种细胞接种2—4个上述培养皿，每个培养皿中有4—8片盖玻片。在细胞处于对数生长期时，先计算其自发微核率，然后每种细胞分两组：①复合处理组：秋水仙胺（1μg/ml）作用24小时，再加CB（5μg/ml）。②单纯用秋水仙胺处理组：秋水仙胺最终浓度为1μg/ml。这两种组合都在每隔6小时取出一片盖玻片用醋酸地衣红染色2—3分钟，再覆以大盖片，在油镜下计数500个细胞，计算其微核率。

结果与讨论

（一）微细胞的成活率〔图1〕　离心纯化后的微细胞的存活率因细胞株的不同而略有差异，Wg3—h刚纯化后的成活率为85%，48小时后降到11.6%。而CHO刚纯化后的成活率为99%，24小时后为7.33%，48小时后只有2%左右。以CHO来说，除去1—2%逃避纯化的全细胞外，大部份微细胞的成活时间约为24小时。Wg3—h的微细胞存活

时间比较长，而刚纯化后的成活率又低于CHO，其原因将在下文讨论。

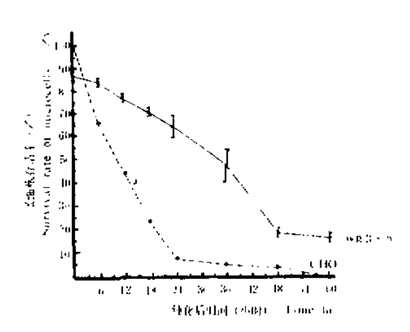


Fig 1. Survival curve of microcells purified from CHO and Wg3— h

（二）微细胞获得率〔表 1〕　我们对CHO和Wg3— h 两种细胞株在相同的条件下分别进行了四次实验，通过压滤纯化，〔图 2，3〕所获得的微细胞数，Wg3— h 明显低于CHO，用牛血清白蛋白梯度沉降法纯化其结果与压滤法一致。说明Wg3— h 不易微核化，因而微细胞获得量也少。

Table 1. The practical yield of microcell by a sequential colcemid-cytochalasin B treatment in CHO and Wg3— h

细胞株	阻断剂	离心纯化后微细胞获得率				
		1	2	3	4	平均
CHO	秋水酰胺＋CB	7.7×10^{6}	2.3×10^{7}	1.37×10^{7}	5.8×10^{6}	1.255×10^{7}
Wg3— h	秋水酰胺＋CB	5.84×10^{5}	3.9×10^{5}	1.65×10^{6}	8×10^{5}	7.66×10^{5}

（三）微细胞和全细胞直径测量结果〔表 2〕　表 2 列出了CHO和Wg3— h 全细胞和微细胞直径的分布范围和平均值，统计学处理，CHO和Wg3— h 全细胞直径无显著性差异（$P>0.05$），而两种微细胞直径相比，CHO（$\bar{x}=4.48$）明显小于Wg3— h（$\bar{x}=5.84$），经统计学处理两种微细胞直径之间存在着高度显著性差异（$P<0.01$）。就分布范围来看，CHO和Wg3— h 微细胞直径一半以上是 2 — 5 μ，而全细胞在这个范围内一个也没有。CHO微细胞和全细胞平均直径之比为 1 ：2.19〔图 4〕，Wg3— h 则为 1 ：1.73。可见 CHO 由于易于微核化，所以微细胞直径比较小。CHO细胞用复合处理方法其微核数在 2 —40不等，最多可见一个细胞核分为58个微核〔图 5，6，7〕。Wg3— h 比较难于微核化因而微细胞也比较大，这可能就是Wg3— h 微细胞存活时间比较长的主要原因。

Table 2. Distribution of diameters of microcells and intact nuclei in CHO and Wg3— h

细胞株	细胞直径(μ)	2—5	5.1—10	10.1—15	15.1—20	20.1以上	平均直径(μ)
CHO	微细胞数目	59	28	12	1	0	4.48
	全细胞数目	0	19	50	18	13	9.82
Wg3— h	微细胞数目	54	33	8	5	0	5.84
	全细胞数目	0	15	56	26	3	10.10

（四）不同细胞株对有丝分裂阻断剂敏感性比较〔图 8〕：

1.单纯用秋水酰胺处理，48小时CHO的微核率37.4%，Wg3— h为 2 %，SL_7为17.8%，HFC为49.3%。

2.秋水酰胺阻断24小时后再加进CB，协同作用24小时，CHO微核率升至61.8%，Wg3— h升至20%，SL_7升至26%，HFC升至64%。

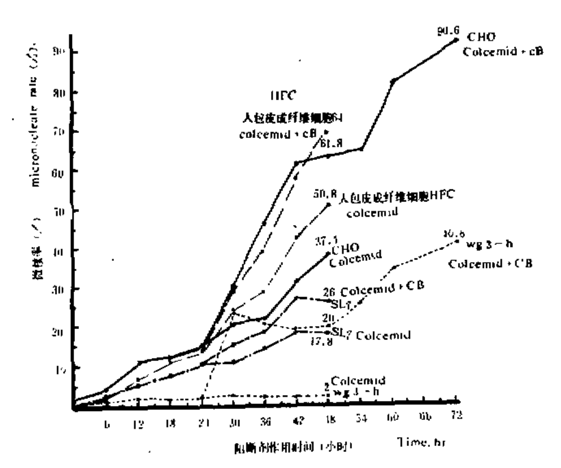


Fig 8. Micronucleate ratio induced by a sequential colcemid-cytochalasin B and colcemid from CHO, Wg3— h, SL_7, and HFC

上述结果可明显的看出，秋水酰胺和 CB 协同作用，对四种细胞株的微核率都高于单纯用秋水酰胺处理的微核率〔图 9〕。这个结果和Fournier等1981年报道的结果一致。但他用的细胞株和我们不同，说明这种现象带有普遍性。我们分析复合处理其微核率所以高可能与CB的多核效应有关，根据 Kenneth 等80年报道，CB 对体外培养的肿瘤细胞和病毒及化学致癌剂转化的细胞都能产生多核效应（Takii，1976）。我们实验室84年建立的人鼠杂种永久细胞系，对 CB 也很敏感，以 2 μg/ml的CB处理对数生长的杂种细胞和亲本细胞（小鼠骨髓瘤细胞），其多核化细胞几乎比未经CB处理的细胞多一倍。

CHO和Wg3—h同是来源于仑鼠的细胞株，但是对于像秋水酰胺和CB这样的有丝分裂阻断剂，其敏感性存在着显著差异，是否是来自不同组织的原因，亦或转化条件不一样，尚有待进一步探索。

SL_7或HFC细胞同是来自人的成纤维细胞，都未经转化，它们对秋水酰胺和CB的敏感性差异，我们认为其主要原因是SL_7已超过30代，因而对阻断剂反应迟钝，而HFC则比较年轻（8代），因而对阻断剂比较敏感。McNeill等（1980）报道也认为未经转化的30代以后的人成纤维细胞不易微核化。

（五）我们采用直立塑料片法离心，比传统的圆型的玻璃或塑料片，其细胞贴附面积要大四倍左右，再加上每个离心管可同时存放两片，增加了脱核细胞数，因而大大地提高了微细胞的产量（薛绍白，1983）。

（六）伴刀豆球蛋白A能与塑料片共价结合，能增强细胞的贴附能力，故离心时细胞不易脱落，这样就不需要预先离心(把贴附不牢的细胞去掉)，可节约时间，并可增加细胞的脱核率。我们还比较了广州医药工业研究所试产的刀豆素和美国（sigma）伴刀豆球蛋白A，其效果无明显差异。

参 考 文 献

薛绍白等 1983 Taxol诱导CHO细胞微核化的动态分析。实验生物学报 16(2):159—162

颜永彬 1983 通过微型细胞转化外源染色体的研究。遗传学报 10(3):209—215

Ege, T. *et al*, 1974 Preparation of microcells by enucleation of micronucleate cells. *Exp. Cell. Res.* 87:378—382

Fournier, R. E. K. *et al.*, 1977 Microcell-mediated transfer of murine chromosome into mouse, Chinese hamster, and human somatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 74(1):319—323

Fournier, R. E. K. *et al.*, 1977 Stable association of the human transgenome and host murine chromosomes demonstraded with trispecific microcell hybrids. *Pros. Natl. Acad. Sci.* USA 74:3937

Fournier, R. E. K. *et al.*, 1981 A general high-efficiency procedure for production of microcell hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 78(10):6349—6352

Kenneth, D. S. *et al.*, 1980 Cytochalasin B- induced multinucleation of human tumor and normal cell cuture. Cell Biology International Reports 4:487

McNeill, C. A. *et al.*, 1980 Genetic manipulation by means of microcell-mediated transfer of normal human chromosomes into recipient mouse cells. 77:5394—5398

Sykes, B. *et al.*, 1978 Assignment of a type I collagen structual gene to human chromosome 7. *Nature.* 272:548—549

Takii, M. *et al.*, 1976 Differential response of cutured mammalian cells by cytochalasin B in nultinucleation. *Jap. J. Exp. Med.* 46:95—100

Worlor, R. G. *et al.*, 1981 The use of selection and counterselection in microcell-mediated transfer of dominant genetic markers. *Cytogenet. Cell. Gnet.* 29:184—188

MICROCELLS, THEIR PREPARATION AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS

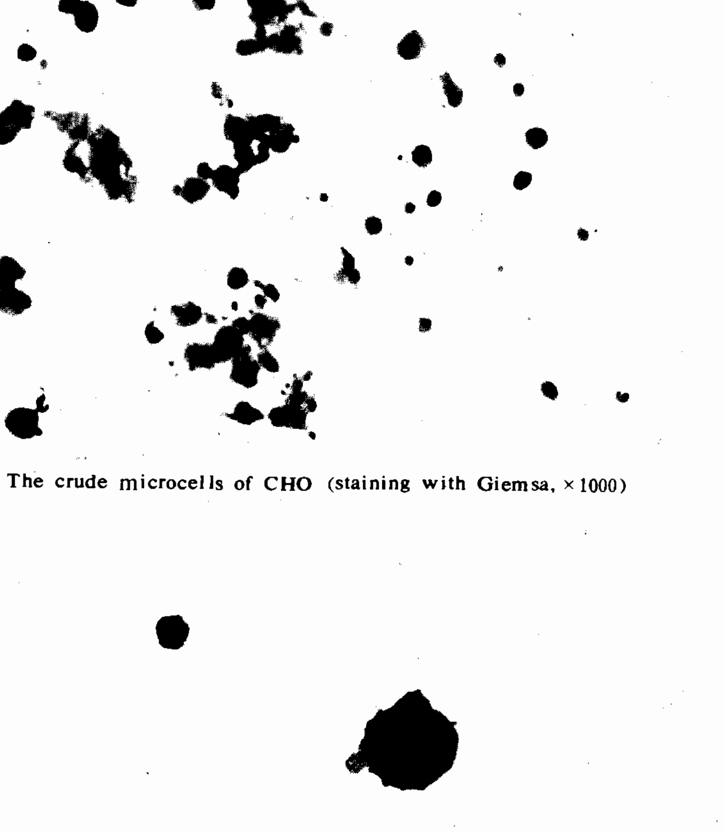
Shan Xiangnian He Lin Wang Shijun

(Department of Cytogenetics, Nanjing Railway Medical College)

1. The exponentially growing population of CHO cells (Chinese hamster ovarian fibroblast) and Wg3—h cells (Chinese hamster lung fibroblast) were micronucleated by treatments in succession with colcemid (1 μg/ml, 24hr) and with cytochalasin B (5 μg/ml, 12hr). The micronucleated cells attached to the plastic slides were enucleated by centrifugation at 19,000 r. p. m. for 30 min in complete medium plus cytochalasin B (10μg/ml) at 34—37°C. The plastic slides were cut from tissue culture flasks with heating needle. The crude microcell preparations were purified by filtration through microporous membrane filters. The survival rates and the diameters of the microcells were studied. In addition, the yield of microcells was counted in each experiment.

2. The sensitivities of CHO, Wg3—h, SL_7, (Human embryo lung fibroblast), and HFC (Human foreskin fibroblast) cells to mitotic arrest agents were compared. The micronucleation rates of the four cell lines produced by colcemid and cytochalasin B tretments in succession were much higher than that induced simply by colcemid.

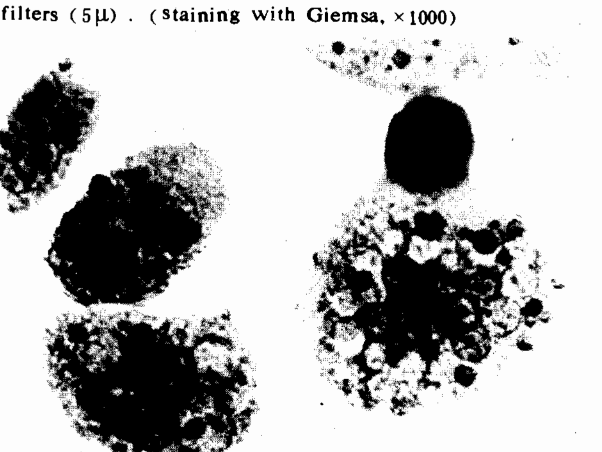
Key words: Microcells Cell line Cytochalasin Gene



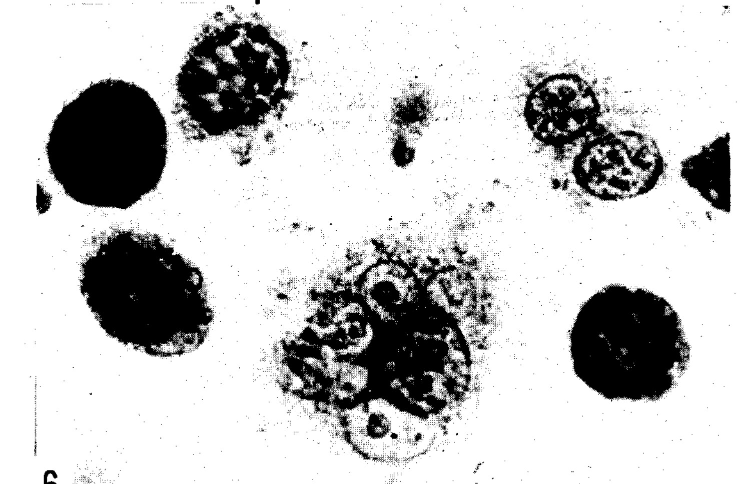
2 Fig. 2 The crude microcells of CHO (staining with Giemsa, ×1000)

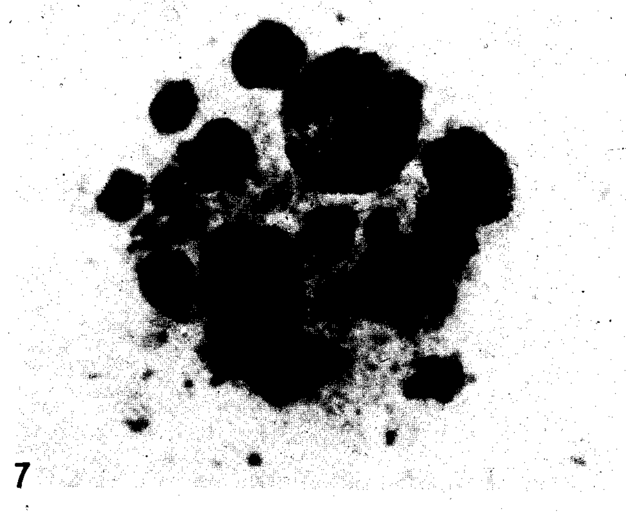
3 Fig. 3 Microcells of CHO filtrated by microporous membrane filters (5μ). (staining with Giemsa, ×1000)

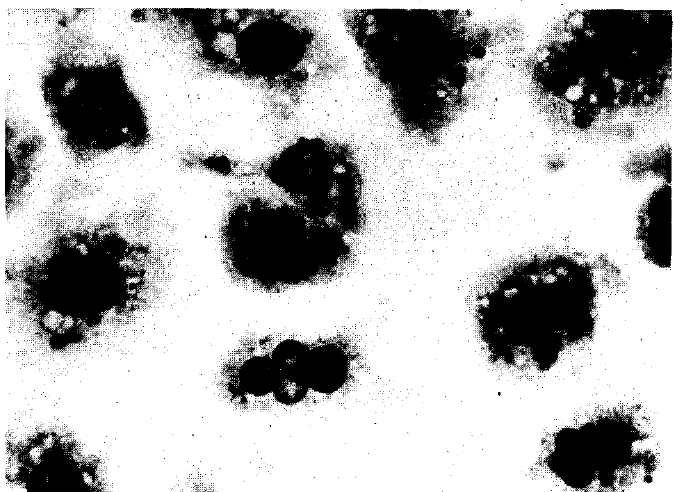
Fig. 4 Comparison of dimeters between microcell and intact nuclei. (staining with Giemsa, ×1000)



5 Fig. 5 Micronucleate cells of CHO induced by a seguential treatment with colcemid (1μg/ml, 36hr.) and cytochalasin B. (5μg/ml, 12hr.) (staining with aceto—orcein, ×1350)







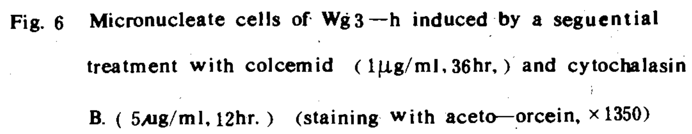


Fig. 6 Micronucleate cells of Wg3—h induced by a seguential treatment with colcemid (1μg/ml, 36hr,) and cytochalasin B. (5μg/ml, 12hr.) (staining with aceto—orcein, ×1350)

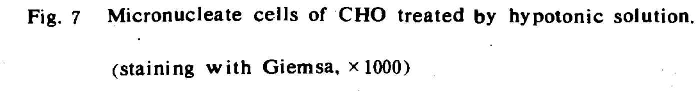


Fig. 7 Micronucleate cells of CHO treated by hypotonic solution. (staining with Giemsa, ×1000)

Fig. 9 Micronucleate cell of CHO induced by colcemid only. (1μg/ml-48hr.) (staining with aceto—orcein, ×1000)